AMRESCO　RiboZol™RNA　Extraction Reagents　(N580-100ML)　1507
取扱説明書

本製品はさまざまなタイプの細胞や組織からトータル RNA を単離するためのフェノール溶液です。ホモジネートと破砕は本製品の溶液中で行われ、すべてのクラスの RNA の分解を最小限にするために RNase 活性を阻害します。本製品を使用したシンプルで効果的な RNA 抽出の手順によって、ホモジネート、層分離、RNA 沈殿化、RNA 洗浄、可溶化の作業を行うことを可能にしています。

本製品で単離した RNA は、以下のアプリケーションにご利用いただけます。

- ノーザンブロット、ドットブロット解析
- RNase プロテクティングアッセイ
- 分子クローニング
- mRNA 単離
- RT/PCR –場合によっては PCR の前に DNAse 処理が推奨される場合があります

【保存温度】

室温で 2 年間安定です

【使用方法】

はじめにお読みください

Note: 本製品はフェノールを含みます。肌や洋服に付着しないようお気を付けください。呼吸から吸引することが無いよう、ドラフト内でのお取扱いをお願いします。注意点や警告はラベルと MSDS をご覧ください。

Note: RNA 実験の一般的な注意事項について

本製品は RNA の分解を防ぎますが、不適切な処理によって RNase の活性にさらされる可能性があります。以下のような RNA ハンドリング方法を心掛けください。

1. 使い捨ての手袋を着用して、皮膚からのバクテリアやカビの混入を防いでください。
2. RNA の取り扱い時には、滅菌済みの使い捨てプラスティック器具をご使用下さい。もし使い捨てではない器具を使用する場合には、RNase を完全に取り除いてください。ガラス製品の場合には 150℃で 4 時間の処理をしてください。プラスチックの場合は RNase　阻害剤で処理するか、0.5M NaOH 溶液に 10 分浸したのちに水でリンスし、オートクレーブにかけてください。
3. クロスコンタミネーションを防ぐために、RNA 実験専用のピペットをご用意ください。
4. 広範囲の作業エリアには、NucleaseEliminator スプレー（E891-100ML-PUMP）または NucleoEliminator Wipe(E891-25PK)を使うことで RNase の混入を防ぐことができ便利です。

手順

<u>RNA 単離</u>

必要な試薬または器具

クロロフォルム、イソプロピルアルコール、75%エタノール(溶媒は RNase free 蒸留水)

滅菌済み Nuclease free 水、0.5% SDS 溶液（溶媒は RNase free 蒸留水）

Note:　単離の作業は室温（15～30℃）の環境で行ってください。

1）. サンプルホモジネート/懸濁

Note: RNA 収率と品質を高めるために完全に細胞を破砕することが大事です。破砕の方法はサンプルによって最適化されるべきです。個々のサンプルによって機械的または酵素反応を利用した破砕方法を検討してください。

Note： 酵素による分解は酵母やバクテリアのような機械的なせん断によって簡単に破砕できない場合に必要になってきます。

Note： 体液のホモジネートに関するインストラクションは英文プロトコールのページ 5 “Special Instruction for Biological Fluids”をご覧ください。

a. 組織の単離
   - Glass-テフロンまたは power homogenizer を使って、50-100mg の組織に対して1mL の本品を加えてホモジネートしてください。
     サンプル体積が、本品の体積に対して 10%を超えないようにしてください。
   - 組織が完全にホモジネートされましたら、ステップ2に進んでください。

b. 植物の組織の単離

   Note： 植物の場合は、その植物の多糖類のレベルと種類、および繊維特性を元に最適化してください。機械的または酵素反応を利用した破砕方法は個々のサンプルによって最適化してください。
   - Glass-テフロンまたは power homogenizer を使って、50-100mg の組織に対して1mL の本品を加えてホモジネートしてください。
     サンプル体積が、本品の体積に対して 10%を超えないようにしてください。
   - 懸濁液を 12,000X g で 4℃、10 分遠心し、不溶成分を沈殿させます。
   - 透明な上清を新しいチューブに移して、Step2）の層分離に進んでください。

c. 接着細胞の単離

   培養しているディッシュの中で直接処理できます。
   - 滅菌環境下で、培地を捨て 10cm^2 の培養面積に対して 1mL の本品を加えます。
   - ピペットのチップ内に吸引、排出を繰り返して細胞を懸濁します。
   - 細胞液を RNase-free のチューブに移してステップ2）に進んでください。

d. 浮遊細胞の単離
   - 浮遊細胞の細胞懸濁液を、RNase-free チューブ内で遠心し、沈殿させてください。
   - 遠心の後、上清を捨てて 5×10^6 の動物、植物、酵母の細胞にたいして 1mL の本品を加えて懸濁します。バクテリアの細胞は1×10^7 の細胞に対して 1mL の本品を加えて下さい。本品を加えるまで、細胞のウォッシュはしないでください。
   - ピペットのチップ内に吸引、排出を繰り返して細胞を懸濁してください。
     Step 2)の層分離に進んでください。

Note: この段階でサンプルを-60℃から-70℃で１か月間保存可能です。保存前にクロロフォルムを加えないでください。

2) 層分離

核タンパク質複合体を完全に分離するために、破砕したサンプルを室温で 5-10 分インキュベートしてください。

- ステップ1）で加えた本品 1mL に対して 200uL のクロロフォルムを加えてチューブのふたをしっかり締めてください。
- チューブ内の溶液を 15 秒間激しく攪拌し、2-3 分室温で静置してください。
- 4℃　12,000X g 15 分間遠心します。
- 遠心後、3 つの層が見えます。
  a. 最下層　赤いフェノール-クロロフォルム層
  b. 白い中間層
  c. 色のない上層の水層（RNA が含まれる）
- RNA は上の水層にふくまれているので注意深く上の水層の 80%を分取してください。
  （ここで、他のタンパク質や DNA がふくまれる層をコンタミさせないように、10～20%はそのままにしてください）
  オプション：　下記ステップに進みますと、水分を加えるために RNA 溶液が薄まります。
  もし薄まることが望ましくない場合は、ここで水層をできるだけ回収してください。
- 残りの 10～20%から回収するために、チューブに残っているフェノール層溶液と等量のヌクレアーゼフリーの水、またはバッファーを加えて下さい。
  ボルテックスで攪拌し、遠心分離を行ってください。
- 上で記述したように、上層の水層を分取し、最初に分取した溶液と合わせて、ステップ3）に進んでください。

Note: 中間層からは DNA を単離することができます。

3) RNA の沈殿化

- 分取した水層に、ステップ1）で始めのホモジネート時に加えた本品の量 1mL に対して 0.5mL のイソフロパノールを加えます。
- 室温で 10 分間サンプルを静置し、4℃で 12,000 X g　10 分間遠心してください。
- チューブの底に遠心の傾きに沿ってゲル状の RNA の沈殿が見えるはずです。RNA の沈殿の量はスタート時の細胞や組織の量に依存します。高純度な RNA ほど、透明に近くなります。
  ステップ 4）の洗浄にすすみます。

⇒植物組織からの RNA 沈殿処理はこちらから

- 分取した水層に、ステップ1）で始めに加えた本品 1mL に対して 0.25mL の 0.8M　クエン酸ナトリウム/1.2M NaCl.を加えます。
- 混合溶液は室温で 5－10 分静置します。
- 4－25℃　12,000 X g　8 分間遠心をし、ステップ 4）の洗浄に進みます。

4）洗浄

- RNA ペレットの層を乱さずに、注意深く上清を除去します。
- ステップ1）で始めに加えた本品 1mL に対して、75%エタノール（溶媒は RNase-free　水）を 1mL 加えボルテックスし、4℃、7,500 X g　4 分遠心します。

Note：　遠心する前に、RNA 沈殿は 75%エタノールを加えて 4℃で 1 週間または-20℃で 1 年保存可能です。

5)RNA ペレットの再溶解

- 4）での最後のエタノールウォッシュの後、ペレットを浮き上がらせることなく注意してエタノールを取り除きます。
- 5－10 分ほど終えペレットを空気乾燥させます。RNA の溶解度を下げるので、完全にペレットを乾燥させないでください。
- RNase-free の水、0.5% SDS 溶液、またはほかの RNA 保存溶液を使って RNA を溶解させてください。5×10^6 個または $10cm^2$ 培養面積につき、50uL の溶液を使用してください。（精製した RNA をその後酵素反応に使用する予定があれば、SDS の添加はお勧めしません。）
- ピペットのチップ内で吸引と排出を繰り返し、55℃から 60℃で 10 分インキュベーションし、完全に溶かしてください。

6）RNA の収量と純度の決定

- RNA 濃度は A_{260} の吸光度で決定することが可能です。
  RNAconc= A_{260}/(I X e)
  I=cuvette path length（cm）
  e=RNA extinction coefficient(25ul/ug/cm)
  RNA の予想される収量は 10 X 10^6 培養細胞から 150-200 ug です。
  RNA 純度は A_{260}/A_{280} の比で換算されます。
  高純度の RNA は 1.6 から 1.8 の値を示しますが、RNA を溶解させている溶液の種類と、RNA の種類に依存します。

Note： RNA を溶かすための水または溶解液は DEPC 処理による RNase フリーの処理をしてください。

<u>DNA の単離</u>

必要な試薬

エタノール
0.1M クエン酸/10%エタノール
エタノール、75% (RNase-free 水)
8 mM NaOH

1) DNA の沈殿

- RNA の単離ステップ2）で水層を完全に取り除いたことを確認してください。
- ホモジネート時に使用した RiboZol 1mL あたり、0.3ml の 100% エタノールを中間層と有機層に加え、チューブを反転させて混和してください。
- 15－30℃で 3 分間インキュベーションしてください。
- 2-8℃で 2,000Xg 5 分間遠心してください。

2) 洗浄

⇒Note：フェノール/エタノールの上清を新しいチューブに保存しておいてください。タンパク質の単離に使用可能です。

- 廃棄または新しいチューブに上清を移します。
- ペレットに 0.1M クエン酸ナトリウム/10%エタノールを 1mL RiboZol につき 1mL 加えます。

- 15℃-30℃で 30 分間断続的に混合します。
- 2－8℃ 2,000Xg 5 分間遠心します。

3） DNA ペレットの再懸濁

- 5-10 分間ペレットを空気乾燥させます。DNA の溶解度が下がるので、完全に乾燥させないでください。
- 8mM NaOH(~pH 9)で DNA を溶かします。
- 12,000Xg 以上、10 分間遠心しますと、不溶性の成分を沈殿させることができます。
- TE を使って pH を 7－8 に調節してください。
- DNA を 4℃または-20℃で保存します。

タンパク質の単離

必要な試薬

エタノール

イソプロピルアルコール

0.3M 塩酸グアニジン（in 95%エタノール）

1%SDS

1） タンパク質の沈殿

- DNAの単離の工程のステップ2）で保存した上清に、イソプロピルアルコールを加えます。RiboZol 1mL あたり 1.5mL 使用してください。
- 15-30℃で 10 分間インキュベーションします。
- 2-8℃ 12,000Xg 10 分間遠心します。

2） 洗浄

- 上清を捨てます。
- 0.3M 塩酸グアニジン（in 95% エタノール）を加えます。（1mL RiboZol に対して 2mL 加えます）
- 15－30℃で 10 分間インキュベーションします。
- 2-8℃で 7,500 x g 5 分間遠心します。
- このステップをさらに 2 回繰り返します。

3） タンパク質ペレットの再懸濁

- 吸引で 5－10 分間乾燥させます。
- 1% SDS を沈殿に加えて、ピペッティングによって懸濁します。
- 2-8℃、10,000 x g で 10 分間遠心することで不溶性の成分を落とすことが可能です。
- 新しいチューブに上清を移します。
- －20℃で保存してください。

【FAQs】

水層がピンク色をしているのはなぜですか？	サンプルに加える RiboZol の量が不十分です。RiboZol/クロロフィルを加えて再抽出してください。
収量が低いです。	1. 細胞または組織を collection 後すぐに調製してください。 2. RNase が混入している。 3. サンプルが完全にホモジネートされていない。 4. 最終的な沈殿を完全に溶解できていない。
$A_{260/280}$ が低いのはなぜですか？	1. 有機層の分取が完全でないことが考えられます。 2. サンプルをホモジネートする際の RiboZol 量が十分でないと考えられます。
DNA のコンタミが多いのはなぜですか？	1. RiboZol の使用量が少なすぎます。 2. 元のサンプルに有機溶媒がふくまれているためだと考えられます。

株式会社エムエステクノシステムズ

●大阪　電話 06-6396-6616

●東京　電話 03-3235-0673